

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-291276

⑬ Int.Cl.³

C 12 N 15/60
1/21
C 12 P 13/06

識別記号

ZNA

庁内整理番号

C 6807-4B
8931-4B※

⑭ 公開 平成2年(1990)12月3日

審査請求 未請求 請求項の数 13 (全18頁)

⑮ 発明の名称 C. グルタミンウム株から単離されたDNAフラグメント、複製ベヒクル、宿主バクテリア、コリネバクテリウム、プレビバクテリウム及びL-アミノ酸の製法

⑯ 特 願 平1-234830

⑰ 出 願 平1(1989)9月12日

優先権主張 ⑱ 1988年9月12日 ⑲ イギリス(GB) ⑳ 8821319.4

⑳ 発 明 者 ヘルント・バツハマン ドイツ連邦共和国ヴエルテル・マイヤーフェルト 10
アー

㉑ 出 願 人 デグツサ・アクチエン ドイツ連邦共和国フランクフルト・アム・マイン・ワイ
ゲゼルシャフト
フラウエンストラーセ 9

㉒ 代 理 人 弁理士 矢野 敏雄
最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

C. グルタミンウム株から単離されたDNAフラグメント、複製ベヒクル、宿主バクテリア、コリネバクテリウム、プレビバクテリウム及びL-アミノ酸の製法

2 特許請求の範囲

1. ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)の活性を有する蛋白質の製造をコードする情報である遺伝子配列を有する、C. グルタミンウム株から分離されたDNAフラグメント。

2. 末端においてSal I制限酵素サイトに接続した本質的に3422個の塩基対から成るフラグメントである、特許請求の範囲第1項記載のDNAフラグメント。

3. PEPCの構造遺伝子をコードする2757個の塩基対から成る、特許請求の範囲第1項又は第2項記載のDNAフラグメント。

4. PEPCの製造をコードし、そのN末端アミ

ノ酸の配列がThr¹-Asp-² Phe-Leu-Arg³-Asp-Asp-Ile-Arg-Phe¹⁰-Leu-Gly-Gln-Ile-Leu¹⁸である、特許請求の範囲第1項から第5項までのいずれかに記載のDNAフラグメント。

5. コリネバクテリウム・グルタミンウム ATCC 13032から分離された特許請求の範囲第1項から第4項までのいずれかに記載のDNAフラグメント。

6. 特許請求の範囲第1項から第5項までのいずれかのDNAフラグメントを含有する、コリネバクテリウム又はプレビバクテリウムにおいて複製できるベヒクル。

7. プラスミドpDM 2又はpDM 6である、特許請求の範囲第6項の表現ベヒクル。

8. 調製アミノ酸を適宜生産する、特許請求の範囲第6項又は第7項記載のベヒクルを含有し、コリネバクテリウム属又はプレビバクテリウム属に属する宿主バクテリア。

9. DSM 4697と同一の特性を有するものの

群より選ばれたコリネバクテリウム。

10. DSM 5397と同一の特性を有するものの群より選ばれたブレビバクテリウム。

11. 特許請求の範囲第8項、第9項又は第10項のバクテリウムを適当な媒質中で培養し、この媒質からL-アミノ酸を回収することから成る発酵による、L-リジン、L-メチオニン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-グルタメート、L-グルタミン、L-プロリン、L-アルギニン、L-シトルリン及びL-オルニチンから選ばれるL-アミノ酸の製造方法。

12. 特許請求の範囲第8項又は第9項に記載のバクテリウムを培養し、L-リジンを回収することから成る、特許請求の範囲第11項の発酵によるL-リジンの製造方法。

13. 特許請求の範囲第8項又は第10項に記載のバクテリウムを培養し、L-イソロイシン及びL-スレオニンを回収することから成る、特許請求の範囲第11項の発酵によるL-イ

ソロイシン等のアミノ酸は、一連の枝分かれしたかつ高度に相互に制御された生合成経路においてL-アスパルテートから誘導されており、一方、L-グルタメート、L-グルタミン、L-プロリン、L-アルギニン、L-シトルリン、L-オルニチン等のアミノ酸はTCAサイクルの中間体から誘導される。

このように、PEPCは上述のすべてのアミノ酸の生合成に関与している。

上述の考察から、L-リジン等のアミノ酸の生合成レベルは、細胞質内のPEPC等の酵素の特異的活性に依存して変化することは明らかである。

アミノ酸の生合成におけるPEPCの果たす重要な役割を考慮すると、PEPCの活性を増大することによりアミノ酸製造のための改善された方法を提供しようとするのは常に望ましい。

例えば、ヨーロッパ特許出願第0143195号明細書は、ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタム(Brevibacterium lactofermentum)

ソロイシン及びL-スレオニンの製造方法。

5 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はPEPCをコードするC. グルタミクム株から分離されたDNAフラグメント及び前記フラグメントを運搬する複製DNA、この複製DNAを運搬する菌株及びこの菌株を用いるL-アミノ酸の製法に関する。

〔従来技術〕

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(EC 4.1.1.3.1; 以下PEPCと記す)は、アミノ酸代謝に特に関係する酵素であり、いわゆるアナプレロティック機能(細胞に常時オキサロ酢酸を供給することを保証する)に関連している。

オキサロ酢酸は、L-アスパルテートの直接の前駆体として、かつ、トリカルボン酸サイクル(TCAサイクル)の一員として、アミノ酸代謝において中心的地位を占めている。事実、L-リジン、L-メチオニン、L-スレオニン及

ATCC 13869から分離されたPPC遺伝子をクローン化すること及びL-リジン又はスレオニンを製造するために、前記遺伝子を選搬する組換えプラスミドによりコリネバクテリウム属の細菌を形質転換することを開示している。

これらの先行技術は、又、C.メラセコーラ(melassecola)のppc遺伝子を運搬する組換えプラスミドDNAにより形質転換されたコリネバクテリウム・メラセコーラ株を開示している。これらの株は、増大されたPEPC活性を示しているが、アミノ酸製造能が増大したことを示す証拠は何もない。(仏国出願第2581653号)これらの刊行物中には、コリネバクテリウム・グルタミクム(glutamicum)から分離されたppc遺伝子をクローン化することにより、アミノ酸、特にL-リジンの発酵による製造を高めることの示唆は何もない。

〔発明が解決しようとする課題〕

本発明者は、コリネバクテリア又はブレビバクテリアにおいて複製能を有する相応するペヒ

グルに PEPC をコードする遺伝情報を導入し、この遺伝情報を運搬する、生成したハイブリッドベヒクルを相応するコリネバクテリア又はプレバクテリア宿主又は受容体 (recipient) 中で複製させると、形質転換された微生物は、L-アミノ酸、殊に、L-リジンのすぐれた生産体となるとの知見を得た。

本発明は、L-アミノ酸を高含量で生産するプレバクテリアウム及びコリネバクテリアウムの多くの株を宿主として使用できるので、殊に重要である。

このように、本発明は、L-アミノ酸を効率的に製造する方法に関し、さらに、この方法に関連する種々の遺伝的及び微生物学的の要素に関する。例えば、本発明は、PEPC のための遺伝子の分離体、この遺伝子を含むし、上述の宿主中で複製しうる種々のベヒクル (Vehicle)、このベヒクルを含む上記微生物の種々のマイクロプ、及び L-アミノ酸の製造のための種々の発酵法に関する。

る。例えば、染色体 DNA とベクタープラスミドを制限酵素で消化 (digest) し、続いて DNA リガーゼで処置するか、又は染色体 DNA とベクタープラスミドを制限酵素で消化し、続いてターミナルトランスフェラーゼ、DNA ポリメラーゼ等により開裂した末端を処置し、さらに引き続いて DNA リガーゼ等により処理する。(Methods in Enzymology 68 (1979))

ppc 遺伝子を分離するために、C. グルタミンム ATCC 13032 のゲノムバンクを、グラム陰性菌エシエリヒア・コリにおいてクローン化するために通常使用されるベクターであるプラスミド pUC 18 中で構成した。ppc 遺伝子を相応する遺伝子において影響された既知の E. コリー突然変異株の相補により分離した。候補クローンを分析し、遺伝子の後継 (sought) を有する挿入断片 (insert) を生産することが遺伝的及び酵素的に示された。

グルタミン生産株で複製しうるベクターに挿入された新しい DNA フラグメントを有する組

(課題を解決するための手段)

本発明は、C. グルタミンム株から分離された、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) の活性を有する蛋白質の製造をコードする情報である遺伝子配列を有する DNA フラグメントに関する。

供与体は、ppc 遺伝子中で突然変異したものか、又は、ppc 遺伝子の野生型のものであつてよい。この DNA フラグメントは、本質的に 3422 個の塩基対から成り、その末端で Sal I 制限酵素サイトに接続しており、PEPC の製造をコードしており、その N 末端アミノ酸配列は Thr¹-Asp - Phe - Leu - Arg⁵- Asp - Asp - Ile - Arg - Phe¹⁰- Leu - Gly - Gln - Ile - Leu¹⁵ である。

PEPC をコードする構造遺伝子は、2757 個の塩基対から成る。

当該 PEPC は、アセチル CoA により刺激されない。ppc 遺伝子から成る DNA フラグメントを含有する組換え DNA は、常法に従つて形成され

換え DNA 分子を製造するために、ppc 遺伝子は、供体 E. コリー及びオリジナルのコリネバクテリアウム宿主又はあらゆる種のグルタミン生産株において増殖しうる、いわゆるプラスミドシャトルベクター (ベヒクル) にサブクローンされた。特に興味あるものは、ベクター pZ 1 及び pCV 22 である。

プラスミド pZ 1 は、コリネバクテリアウムグルタミン生産株及び E. コリーにおいて増殖しうるドライブユニット領域から成り、1 炭物に抵抗を示す少なくとも 1 領域を有する。pZ 1 は、独逸特許出願 37 57 729.9 号明細書に開示されている。

pCV 22 は本質的に純粋なプラスミッドであり、4.5 Kb の長さ及び第 6 図に示した制限酵素切断地図により特徴づけられるものである。

このベクターは、寄託された微生物の細胞を、現在の技術により溶解 (lysing) することにより得られる。

野生型の又は突然変異型の ppc 遺伝子を含有

する組換え DNA は、既知の形質転換法により、好ましくは、コリネバクテリウム又はプレビバクテリウム属の微生物中に導入することができる。

これら微生物中において複製しうるベヒクルは、プラスミド pDM 2 又は pDM 6 である（第 5 図及び第 7 図の制限酵素地図に図示）。

C. グルタミクム、C. メラセコーラ、B. ラクトフアーメンタム及び B. フラバム (B. flavum) は、受容体又は宿主として好ましいものであり、とりわけ、アミノ酸製造のために既知のものが好ましい。

形質転換された株中において ppc 遺伝子を発現するためには、コリネバクテリウム又はプレビバクテリウム中で有効であることが知られているすべてのプロモーターを使用することができる。それらは、この株にもともと属している遺伝子の発現をコントロールするプロモーターであるこの株の内在性プロモーターである。それらは、また、外来性のプロモーターであり、

これらのプロモーターには ptac、plac、ptsp、ファージ λ の PR 及び PL を挙げることができる。

この発明のもう一つの目的は、株に L-リジン、L-メチオニン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-グルタメート、L-グルタミン、L-プロリン、L-アルギニン、L-シトルリン及び L-オルニチンから選ばれるアミノ酸、特に L-リジンの製造する方法である。

得られた L-アミノ酸製造株の培養法は常法のものであり、既知の L-アミノ酸製造菌の培養法に類似している。使用される培養媒体は、炭素源、窒素源、有機イオン及び必要に応じて、ビタミン、アミノ酸等の有機微量栄養素を含有する通常の媒体であつてよい。適当な炭素源の例は、グルコース、サツカロース、ラクトース、澱粉加水分解液及び糖みつである。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水溶液、アンモニア塩及び他の窒素含有物質を使用できる。

ppc 遺伝子を運搬するベヒクルを有する形質転換された微生物の培養は、pH 及び温度を適当

なレベルに調節した媒体中で好氣的条件下に行われ、L-アミノ酸の形成が終了する迄続けられる。好ましい態様において、形質転換されたコリネバクテリウム・グルタミクムを使用し、1988年7月8日のプラザベスト条約の規定の下に、ドイツ微生物寄託機関 (DSM) に寄託されたコリネバクテリウム・グルタミクム DSM 4697 と同一の特徴を有するものから選ぶ。

媒体中に蓄積されたアミノ酸は、常法により採取される。この発明の方法により、L-アミノ酸、特に L-リジンは、プレビバクテリウム及びコリネバクテリウムの人工の突然変異体を使用する既知の方法における収量よりも、高い収量で生産することができる。

〔実施例〕

この発明を一般的に記述したが、特定の实例を参照することにより一層理解されるであろう。かかる实例は、説明を目的とするだけであつて、特に明示されない限り、この発明を限定するものではない。

1. コリネバクテリウム、グルタミクム ATCC 13032 ppc 遺伝子の分離
- 1.1. C. グルタミクム ATCC 13032 のゲノムバンクの構成 C. グルタミクム ATCC 13032 の DNA の全量を Chater らが記載のようにして (Curr. Topics Microb. Immunol. 96, 69 pp (1982)) 分離し、Sau 3AI にて部分的に消化させた。4~20 Kb の大きさのフラグメントを低熔融点アガロースから精製した。この DNA 溶液を 2 リットルの TE 緩衝液 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) で透析させた。2 μ g のサイズフラクションされた染色体 DNA を、Bam HI で消化され、アルカリホスファターゼで処理されたプラスミド pUC (Yanish-Perron, C. ら、(1985) Gene 53, 103 pp) 1 μ g を有する T4 DNA リガーゼを使用して、接続 (ligated) させた。E. コリー NM 522 (Gough, J.A and Murray, N.E. (1983) J. Mol. Biol. 166, 1 pp) を、Hanahan の方法 (J. Mol. Biol. 166, 557 pp,

(1983))に従って接合(ligation)混合物を用いて形質転換させ、形質転換体を、アンピシリン(100 µg/ml)及び5-プロモ-4-クロロ-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド(X-gal, 50 µg/ml)を含有するLB寒天板(Davis, R.W. ら(1980) Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory)上で37℃にて選択した。80%のクローンはX-gal板上で無色であり、挿入されたDNAの存在を示した。より詳細にクローニングの効率を定値するために、46個の無色のクローンからのプラスミドDNAを制限酵素の消化により試験した: 7%のクローンは挿入断片を有していなかった。41%のクローンは、平均サイズが0.5 Kbの小さな挿入断片を含んでいた。52%のクローンは、1.35 Kbから8.5 Kbに亘り、かつ平均サイズが5 kbの挿入断片を有していた。

NM 522株の形質転換により合計10%のクローンが得られた。これらのクローンを4系統

(Cg8A, Cg8B, Cg8C及びCg8D)にプールし、CgC8-EtBr密度勾配遠心分離によりプラスミドDNAを調製した。

1.2. ppc遺伝子のクローニング B. コリー XH 11 (Mountain A. ら, (1984) Mol. Gen. Genet 197, 82 pp)の適切な細胞を5×200個の各系統のC. グルタミクムの遺伝子バンクを用いて形質転換させた。形質転換混合物を、アルギニン(50 µg/ml)及びアンピシリン(100 µg/ml)を加えたMg寒天(Miller, J.H. (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory)及びアンピシリン(100 µg/ml)を加えたLB上に拡散させた。アンピシリン添加LB上において、10⁶/µgの形質転換頻度が得られた。Cg8D系による形質転換から、アルギニンとアンピシリン含有Mg寒天上で108のクローンが分離された。分離されたDNAの制限酵素による消化は、すべてのクローンが同一のプラスミドを含有していることを示

した。このプラスミド(pTO 1200)は、pUC 18と約5 kbの挿入断片から構成されている。pTO 1200の挿入の制限酵素地図を、第1図に示す。pTO 1200によるXH 11の再形質転換は、ppc突然変異の相補につながる。サザン・ハイブリッド形成(Southern hybridization)(Maniatis, T. ら, (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory)は、C. グルタミクム ATCC 13032の染色体DNAがpTO 1200においてクローン化されたことを確認した。

1.3. クローン化DNAフラグメント上のppc遺伝子の局在

ppc遺伝子をうまく局在させるため、サブクローニング実験を行なった。Sal IによるpTO 1200の消化は、3.5 kbの内部フラグメントを生成した(第1図)。Sal Iにより消化されたpTO 1200は、Sal I 切断pBR 322 (Bolival, F. ら, (1974) Gene, 2, 95 pp)を用いて接続させた。再接続された

pTO 1200分子を脱離させるため、接続反応混合物をXbaIで消化させた。E. コリー XH 11をこの接続反応混合物で形質転換され、アルギニンとアンピシリンを含有するMg寒天上に塗布した。相補クローンのプラスミドDNAを試験し、pBR 322とpTO 1200の3.5 kb Sal Iフラグメントから成ることが発見された。構成されたプラスミドを、pTO 1201と命名し(第2図)、相応する株をXH 11/pTO 1201と命名した。

1.4. C. グルタミクム ppc遺伝子による、C. グルタミクム ATCC 13032、及びDNAフラグメントを含有する組換プラスミドを運搬するE. コリークローンにおける酵素活性の測定

ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性を、C. グルタミクム ATCC 13032及びE. コリー株XH 11/pTO 1201で測定した。B. コリー株MM 294 (Hanahan, D. ら, (1983) J. Mol. Biol. 166, 557 pp)をポジティブのコントロールとして、XH

11株をネガティブのコントロールとして使用した。C. グルタミンム ATCC 13032 を MME 媒質 (Katsumata, R. ら、(1984)、J. Bact., 159, 306 pp.) 中で培養し、E. コリー株を XH11 / pTO1201 の場合は、アルギニン (50 μ g / ml) 及びアンピシリン (100 μ g / ml) で補足された M9 媒質中で、MM294 の場合はチアミン (200 μ g / g) で補足された M9 媒質中で、XH11 の場合はコハク酸ナトリウム (5g / g) 及びアルギニン (50 μ g / ml) で補足された M9 媒質中で培養した。成育条件は、E. コリー株に対しては 37°C、150 rpm であり、C. グルタミンムに対しては 30°C、150 rpm であった。

培養物を、成育の定常期の初めに遠心により採取し、100 mM の Tris / HCl (pH 7.5) 及び 1 mM の DTT で構成された緩衝液で 3 回洗った。細胞の分解はガラスビーズ粉砕器 (MSK ホモゲナイザー: B. Braun Melungon, FRG) で行つた。透明な上澄み液中での PEP カルボキシ

ラーゼ活性を、100 mM Tris / HCl (pH 7.5); 0.8 M の硫酸アンモニウム; 1 mM DTT で広く透析を行つた後に測定した。変性マレートデヒドロゲナーゼ組合せアッセイ (Osaki, H and Shilo, J. (1969) J. Biochemistry 66, 297 pp) を使用し、NADH の消失を 340 nm で光学的に追跡した。このアッセイ混合物は、1 ml の最終容積中に次の成分を含有していた: 6 mM PEP; 10 mM NaHCO₃; 100 mM Tris / HCl (pH 7.5); 0.15 mM NADH; 2 U / ml マレートデヒドロゲナーゼ (ブタ心臓); 3.3 mM MnSO₄ 及び PEP カルボキシラーゼ調製物。Mn²⁺ の添加による反応の開始前に非特異的な NADH 分解物を測定した。蛋白質濃度は、Lowry らの方法 (Lowry, O.H. ら、(1951) J. Biol. Chem. 193, 265 pp) 又は Bradford らの方法 (M.M. Bradford (1976) Analyt. Biochem. 72, 248 頁) で測定した。第 1 段に示されたデータから、C. グルタミンム ATCC 13032 よりクローン化され、pTO

1201 プラスミド中に含まれた 3.5 kb の Sal I DNA フラグメントは、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子をコードしていることを確認できる。

特に、E. コリーからのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを刺激する (Izui, K. ら、(1981) J. Biochem. 90, 1321 pp)、かつプレバクテリウムフラバム (Osaki, H. ら (1969) J. Biochem. 66, 297 pp) からのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを刺激することが知られているアセチル-CoA の作用を検討した。第 1 段に示された結果から、C. グルタミンム ATCC / 3022 からのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼは、本来の宿主中で生産されたもの、XH11 / pTO1201 株を形成するために、E. コリーにクローン化した結果として生産されたもの、上述のアッセイ条件下ではアセチル-CoA により刺激されないことは明らかである。

第 1 段 C. グルタミンム及び異なる E. コリー株から得られ透析されたホモゲネート中のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性

株	ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性 (U / mg 蛋白質)	
	アセチル-CoA がないもの	0.2 mM アセチル-CoA の存在において
C. グルタミンム ATCC 13032	0.226	0.225
E. コリー-MM294	0.055	0.158
E. コリー-XH11 / pTO1201	1.010	1.090
E. コリー-XH11	0.0	0.0

2 C. グルタミンム ATCC 13032 の ppc 遺伝子のヌクレオチド配列の決定
pTO1200 の全 5 kb 挿入フラグメントのヌクレオチドの配列を、ショットガンアプローチ (Messing, J. ら、(1981) Nucleic Acids Res. 9, 309 pp) を使用して決定した。

pTO 1200 の Sma I サイトを、pTO 1202 と呼ばれる新しいプラスミドを生産するために、平滑断端 (bluntended) オリゴマー (GTGTCTACA-GTG) のクローン化により XbaI サイトで置換した。10 µg の pTO 1202 の 5.0 kb XbaI 挿入フラグメントを低温溶融性のアガロースから精製した。このフラグメントを、T4 DNA リガーゼを使用して再循環させ、音波処理によりランダムに断片化し、最後に各々 2 mM の dATP、dGTP、dCTP 及び dTTP の存在下でクレノク (Klenow) ポリメラーゼを使用して平滑断端化した。300 ~ 800 bp の大きさのフラグメントを低温溶融アガロースから分離し、SmaI 消化 M 13 mp 8 ファージ (Messing, J. and Vieira, J. (1982) Gene 19, 269 ~ 276) により接続させた。160 のクローンがチェーンターミネーション法 (Sanger, P. ら、(1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 頁) により配列決定され、コンピュータを使用した分析 (DNASTAR, Inc, 1801,

University Ave., Madison, WI 53705, USA, 74, 5463 pp) により重複クローンが同定された。C. グルタミクム ATCC 13032 の ppc 遺伝子を伝える pTO 1202 中に含まれる挿入された DNA フラグメントの全配列を、第 3 図に示す。ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼに対応する予想されるアミノ酸配列が対応する DNA 配列の下に示されている。

決定された全配列の長さは 4885 bp である。蛋白質をコードしている領域の検索では、長開放読み枠 (long open reading frame; ORF) が E. コリイからの ppc 遺伝子の配列 (Fujita, N. ら (1984) J. Biochem. 95, 909 pp) 及び他の種 (Katagiri, F. ら、(1985) Gene 38, 265 pp and Izui, K. ら (1986) Nucleic Acids Res. 14, 1615 pp) の ppc 遺伝子の配列と相同性を示し、この ORF は PEP カルボキシラーゼ遺伝子をコードしていることを示していることがわかった。この ORF は、pTO 1201 中でクローン化された、652 ~

4077 のコーディネートの間に広がる 3.5 kb Sal I DNA フラグメント内に含まれている。配列分析では、それぞれ 919 又は 924 のアミノ酸から成る蛋白質生成物を与える 2 つの可能な翻訳の出発サイト (コーディネート 921 及び 906) を確認した。

2.1. PEP カルボキシラーゼ蛋白質の N 末端配列の決定

ppc 遺伝子生成物の開始コドンを経密に同定するために、PEP カルボキシラーゼ蛋白質の N 末端アミノ酸配列を決定した。

C. グルタミクム ATCC 13032 からの PEP カルボキシラーゼの精製を、ガラスビーズ MBK - 粉砕器を使用して細胞を破壊した後に行つた。0 ~ 3 日の菌液ストレプトマイシンにより殺菌を沈殿させた後、分画化された菌液アンモニウム (0 ~ 50 日及び 50 ~ 70 日) 沈殿を行つた。50 ~ 70 日菌液アンモニウム沈殿から再溶解させたペレットを出発緩衝液 (20 mM Tris / HCl pH 7.5 ; 100 mM (NH₄)₂SO₄ ; 1

mM DTT) に対して透析させ、さらに Q セフアロース速流上でイオン交換クロマトグラフィーで精製した。その後、濃縮 PEP カルボキシラーゼ分画を、セフアクリル B 300 スーパーファイン (Sephacryl B 300 Superfine) 上でゲル-濾過し、溶出は安定化緩衝液 (100 mM Tris / HCl pH 7.5 ; 800 mM (NH₄)₂SO₄ ; 1 mM DTT) で行なつた。最後に、試料をブルーセフアロース上でアフィニティークロマトグラフィー工程で処理し、L-アスパルテート (70 mM) を使用して溶出させ、アスパルテートを除去するために安定化緩衝液で透析した。SDS - PAGE で均一であることが確認された PEP カルボキシラーゼ分画を次いでスピード-バク (speed-vac) 濃縮機を 5 °C で使用して約 4 倍に濃縮した。

酵素分画 (1 ml が 25 µg の蛋白質を含有している。) の脱塩を、5 ml の Tris / HCl 100 mM pH 7.5 で希釈することにより行つた。次に試料を YM 30 膜 (直径 2.5 cm) を使用する

8400 アミコン濃縮機 (Amicon) で最終容積 1.5 ml まで濃縮した。この過程を 2 回繰り返した。濃縮された溶液は 3 個の 2 ml のエッペンドルフ管に分けた。次に、各エッペンドルフ管にエタノール (2 ml) を加えた後、 -80°C で 48 時間かけて蛋白質沈殿を行なった。ペレットを集め、 -80°C に冷却されたエタノール/水 (80/20 v/v) で 2 回洗浄した。試料を溶解中に可溶化した後で、配列決定のためにプリサイクル (precycle) フィルターにかけた。配列決定は、オンライン 120 A PTH 分析機により、アプライド・バイオシステム (Applied Biosystem) 470 A 蛋白質配列決定機にて実施した。

その配列は次のとおりである：

Tbr¹- Asp - Phe - Leu - Arg⁰- Asp - Asp - Ile - Arg - Phe - Leu - Gly - Gln - Ile - Leu¹³

この結果は、PEP カルボキシラーゼが、921 位の ATG コドンと 3678 位の TAG コドンの間

4242 としてドイツ微生物寄託機関に寄託されている。

3.2. ppc 遺伝子の *C. glutamicum* / *E. coli* シヤトルベクター pZ1 へのクローニング
プラスミド pTO1200 を、*E. coli* XH11 / pTO1200 から分離し、Sau3A で部分的に消化し、DM272-5 (=DSM4242) から分離されたプラスミド pZ1 を Bgl II で線形化 (linearized) した。双方の DNA を混合し、T4 DNA リガーゼで接合させ、この接合混合物を、*E. coli* XH11 を形質転換するために使用した。形質転換体を、アルギニン (50 μg /ml) 及びカナマイシン (10 μg /ml) を含有する M9 培地上で選択した。XH11 / pDM2 と呼ばれる形質転換体の 1 つからのプラスミド-DNA を分離し、制限酵素地図により特徴づけた。pDM2 の構造は、第 5 図に示されている。酵素測定により、XH11 / pDM2 株が、XH11 / pTO1201 株について第 1 表に示したとおり、アセチル-CoA によつては刺激されない

に広がる 919 箇のアミノ酸の ORF によりコードされていることを示している。開始コドンは、推定のシヤイン・ダルガルノ配列から約 14 塩基対下流に存在する (コーダイネート 900~908、第 5 図)。

3. *C. glutamicum* ATCC 13032 中における *C. glutamicum* からの ppc 遺伝子のクローニング及び発現

3.1 *C. glutamicum* / *E. coli* シヤトルベクター pZ1 の構成

プラスミドシヤトルベクター pZ1 の構造は、第 4 図に示されている。これは、*E. coli* ベクター pACYC177 (Chang, A.C.Y. 及び Cohen, S.N. (1978) J. Bact. 134, 1141 pp) から、及び *C. glutamicum* プラスミド pHM1519 (Miwa, K. (1984) Agric. Biol. Chem. 48, 2901 pp) から、ドイツ特許第 3737729.9 号明細書に記載のように構成された。プラスミドベクター pZ1 を含有する *E. coli* 株 DM272-5 は、DSM

(第 2 表) ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性を有することがわかった。

第 2 表 *C. glutamicum* ATCC 13032 及び *E. coli* 株 XH11 と XH11 / pDM2 から得られる遊析されたホモゲネートにおけるホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性

株	ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性 (U/mg 蛋白)	
	アセチル-CoA なし	0.2 mM アセチル-CoA の存在下
<i>C. glutamicum</i> ATCC13032	0.226	0.225
<i>E. coli</i> XH11	0.0	0.0
<i>E. coli</i> XH11 / pDM2	0.261	0.272

3.3. *C. glutamicum* ベクター pCV22 の構成
C. glutamicum ATCC 13032 から分離されたプラスミド pHM1519 (Miwa, K. (1984) Agric. Biol. Chem. 48, 2901 pp) を Bgl II で切断し、Bam HI で切断された

pUC 8 (Vieira, J and Messing, J (1982) Gene 19, 259 pp) 誘導体 pSVB 21 (Arnold, W. 他, Gene (1988) 70, 171 pp) に接続された。この接続混合物を、E. コリー株 JMB 3 (Vieira, J and Messing, J. (1982) Gene 19, 259 pp) を形質転換するために使用し、形質転換体をアンピシリン含有 LB 寒天上で選択した。形質転換体の1つからプラスミド DNA を分離し、pECB 100 と称した。Ta 5 のカナマイシン抵抗性の遺伝子 (Jorgensen, R.A. 他 (1979) Mol. Gen. Gen. 177, 65 pp) が Ta 5 を運搬する pACYC 184 (Coan, A.C.Y and Cohen, S.N. (1978) J. Bact. 134, 1141 pp) 誘導体から、XhoI - Sal I DNA フラグメントとして分離し、pECB 100 の Sal I サイトに挿入して pECB 300 を形成させ、これを、形質転換 (Yoshihama, M 他 (1985) J. Bact. 162, 591 pp) により C. グルタミンicum ATCC 13032 に移した。

3.4. ppc 遺伝子の C. グルタミンicum ベクター pCV 22 へのクローニング

臭化エタジウム CsCl 密度勾配遠心分離法により E. コリー XH 11 / pDM 2 株からプラスミド pDM 2 を分離し、Yoshihama 他 (1985) J. Bact. 162, 591 pp) の記載のようにして (J. Bact. 162, 591 pp (1985)) C. グルタミンicum ATCC 13032 を形質転換するために使用した。形質転換体の1つからプラスミド DNA が分離され、pDM 2 の構造をもつことが判った。

Sal I で切断された ATCC 13032 / pCV 22 からプラスミド pCV 22 を分離し、子ウシの腸アルカリホスファターゼにより処理した。プラスミド pDM 2 を Sal I 及び Bma I で切断した。両方の DNA を混合後、T4 DNA リガーゼにより接続させ、この接続混合物を C. グルタミンicum ATCC 13032 を形質転換するために使用した (Yoshihama, M. 他 (1985) J. Bact. 162, 591 pp)。形質転換体の1つから pDM 6 と命名されたプラスミド DNA を分離し、

Bma I で消化された ATCC 13032 / pECB 300 株からプラスミド pECB 300 を分離し、再び接続させ、C. グルタミンicum ATCC 13032 を形質転換するために使用した。C の形質転換体の1つからプラスミドを分離し、制限酵素地図により特徴づけ、pECB 330 と称した。

β -ラクタマーゼ抵抗性遺伝子を含む E. コリーのレプリコンを pECB 330 から Hind III で消化、再接続及び形質転換により削除して、C. グルタミンicum ベクター pCV 20 を構成した。

プラスミド pCV 20 を Bma I で消化し、E. コリー Lac Z プロモーター及び多クローニングサイトを運搬する pUC 19 の 0.522 kb Pvu II フラグメントと接続させた (Yanisch-Perron, C 他 (1985) Gene 33, 103 pp)。C. グルタミンicum ATCC 13032 を、この接続混合物で形質転換させた。プラスミド DNA を形質転換体の1つから分離し、pCV 22 と命名し、その構造を制限酵素地図により確認した。上述の構成を有する pCV 22 構造体を第6図に示す。

制限酵素地図により特徴づけた。pDM 6 の構造は第7図に示されている。

3.5. ppc 遺伝子と共に DNA フラグメントを有する宿主プラスミドを運搬する C. グルタミンicum クローニングにおける酵素活性の測定、C. グルタミンicum 株 ATCC 13032 / pCV 22, ATCC 13032 / pDM 2 及び ATCC 13032 / pDM 6 中でホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼを測定した。結果を第3表に示した。

第 3 表 種々の C. グルタミンicum 株から得られた透析されたホモゲネート中のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性

C. グルタミンicum 株	ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ活性 (U/mg 蛋白)
	アセチル-CoA の非存在下
ATCC 13032 / pCV 22	0.250
ATCC 13032 / pDM 2	0.240
ATCC 13032 / pDM 6	0.996

4. プラスミド pDM 6 の pEP カルボキシラーゼ活性及びリジン分泌株 C. グルタミクム DM 58-1 のリジン分泌に対する作用

C. グルタミクム株 DM 58-1 は、株 ATCC 13032 の誘導体であり、50 mM の L-リジン類似の 8-2-アミノエチル-DL-システインに抵抗性であり、通常の N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン突然変異誘発により得られる。

プラスミド pDM 6 と対照としてのプラスミド pCV 22 を C. グルタミクム DM 58-1 中に導入して、DM 58-1 / pDM 6 及び DM 58-1 / pCV 22 を生ぜしめた。株 DM 58-1 / pDM 6 は DSM 4697 としてドイツ微生物寄託機関に寄託された。特異的な PEP カルボキシラーゼ活性及び分泌されたリジン濃度ならびにシロ糖消費量を測定して得られた結果を図 4 表に示す。

分泌されたリジン濃度に対するプラスミド pDM 6 のクローン化された ppc 遺伝子により選

成される高められたレベルの PEP カルボキシラーゼの刺激効果及び、特に、消費されたサツカロース量当たりの形成されたリジン量である収量に対する刺激効果は明らかである。

図 4 表 C. グルタミクムによるリジン分泌に対する PEP カルボキシラーゼの増加されたレベルの効果

株	PEP カルボキシラーゼ活性 (U/mg 蛋白)	分泌された L-リジンの濃度 (g/l)	収量 L-リジン (g) / サツカロース (g)
C. グルタミクム DM 58-1	0.275	16.1	0.170
C. グルタミクム DM 58-1 / pCV 22	0.240	15.9	0.173
C. グルタミクム DM 58-1 / pDM 6	0.955	17.9	0.198

12g/l の炭酸アンモニウム、240g/l の糖みつ、60ml/l の大豆蛋白水解物及び10g/l の炭酸カルシウムから成る媒質10

ml を含有し、へこみ部を有する100ml のフラスコ中で培養を行つた。DM 58-1 / pCV 22 と DM 58-1 / pDM 6 株の場合には、この媒質は20μg/ml のカナマイシンを含有した。培養を30℃、300 rpm で48時間実施した。培養終了後、培養上澄み液中のリジンをイオン交換クロマトグラフィー及びニンヒドリン検出を使用するアミノ酸分析法により定量的に測定した。ヘキソキナーゼ及びグルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼと組合せたインペルターゼを使用して酵素的なアッセイにより定量的にサツカロースを測定した (Technicon Application Note AAII : サツカロース及びグルコース)。

5. B. フラバム DM 368-2 株のスレオニンとイソロイシン分泌に対するプラスミド pDM 6 の作用

B. フラバム株 DM 368-2 は株 ATCC 14067 の誘導体であり、4 μg/ml のスレオニン類似の α-アミノ-β-ヒドロキシ吉草酸に抵抗性で

あり、通常の N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン突然変異誘発の便で得られる。

C. グルタミクム DM 58-1 / pDM 6 (=DSM 4697) からプラスミド pDM 6 を分離し、B. フラバム DM 368-2 に導入して、DM 368-2 / pDM 6 株を得た。DM 368-2 株を DSM 5399 としてドイツ微生物寄託機関に寄託した。分泌された L-スレオニン及び L-イソロイシンの濃度及びシロ糖消費に与えるプラスミド pDM 6 の作用を図 5 表に示す。

分泌されたスレオニンとイソロイシン濃度に対する、プラスミド pDM 6 中に含有されるクローン化された ppc 遺伝子の刺激作用及び特に、消費されたサツカロースの量に対する形成されたアミノ酸量である収量に対する刺激作用が明らかである。



第 5 表 B.フラバムにより分泌されたスレオ
ニン及びイソロイシンに対する pDM
6 の効果

株	分泌された アミノ酸	分泌された アミノ酸濃度	収 量 アミノ酸(g) サツカコース(g)
B.フラバム DM368-2	L-スレオニン	5.52	0.0524
	L-イソロイシン	0.92	0.0090
B.フラバム DM368-2	L-スレオニン	5.77	0.0570
/pDM 6	L-イソロイシン	1.08	0.0106

第 5 図は pDM 2 の制限酵素地図であり、

第 6 図は pCV 2 2 の構成及び制限酵素地図で
あり、

第 7 図は pDM 6 の制限酵素地図である。

代理人 弁理士 矢 野 敏 雄



この培養は、4 に記載したようにして実施し
た。

4 図面の簡単な説明

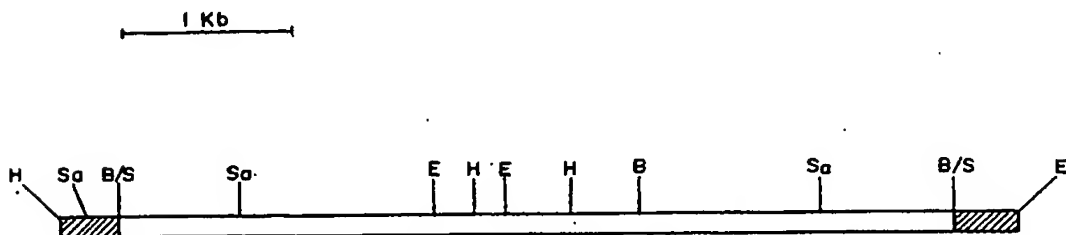
第 1 図は pTG 1 2 0 0 の挿入の制限酵素地図で
あり、

第 2 図は pTG 1 2 0 1 の制限酵素地図であり、

第 3 図は ppc 遺伝子を有する pTG 1 2 0 0 に
挿入された DNA フラグメントのヌクレオチド配
列を示す図であり、

第 4 図は pZ 1 の制限酵素地図であり、

白色棒部…5 kb 挿入断片；ダッシュのある棒部…pUC18 ベクターのポリリンカー。
H…Hind III；Sa…Sall；B…BamHI；E…EcoRI；B/S…BamHI/
Sau3A ハイブリッド。



F I G. 1

太線部... ppc ORFを生産する3.5 kb Sal Iフラグメント。
 細線部... pBR322ベクター。41テトラサイクリン抵抗性決定基
 のプロモータの位置及び方向を示す。

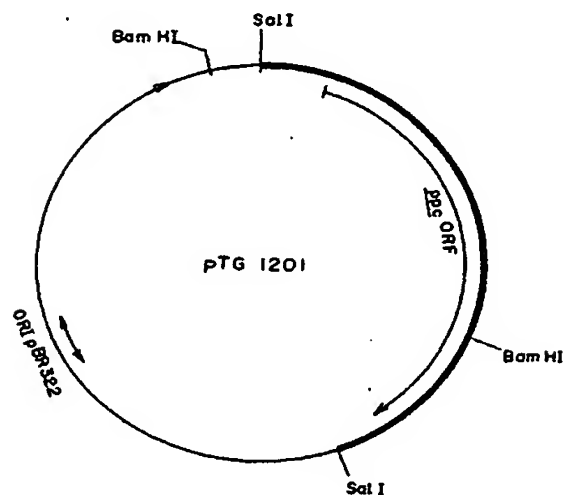


FIG. 2

FIG. 3(1)

```

GATCACCAGCAGGCAATCGGCACTGTTGAGAAAGCTTGCATTGCGCCTTCCAAAGGAATACTTCGAGAAAGGTTGACGTTGCAGTCACCGTTCCCTTCACTG
100
ACATCCGCTCCGTCAGACTCTCGTTGAGGGGCAACAGCTTGAGGTCACTTTCGGTGCTCAGGACGCTCTCCAGCAGGAGTCCGGTGGGTACACCGGTGA
200
AGTTTCTGCAAGCATGCTGGCAAGTTGAACTGCTCTTGGGTTGCTGTTGGACACTCCGAGCGCGGAGTACCAACAACGAGTCTGATGAGTTGGTTGCT
300
GCGAAGGCAAGGCAAGCTCTGTCCAAGCGGCAAGCGGATCGTCTGCGTTGCTGAGGCACTGGAAATCCGTGAAGCTGGCAGCCCAAGTTGAGTAAGTGG
400
TCGAGCAGACCCGTAAGTCCCTTCTGGCTGCTGCTGCTGAGCTGGCAACACCGTTATCGGATGAGCCAGTGTGGGCTATCGGCAACCGTAAGGT
500
TGCTTCCGAGCTGACGCTCAGGAAGTGTCCAAGGATATCGCGGCTGATCGTGGAGCTTGACGGCGACGAGGTGCTGAGGGGCTGCGTATTCTTTAC
600
GGTGGTTCTGTTAAGGCAGAAACCGTCGCTGAGATCGTGGGTGAGCTGACGTGAGCGGGGACTTGTGGGTGGCGCTTCCCTCGACGGTGAAGCATTCG
700
CCAAGCTGGCTGCCAAGCTGCGAGGTTGCTTAAAGTACAGAGCTTTAAAGCACAGCCTTAAAGCACAGCCTTAAAGCACAGCAAGCAAGCAAGTGGG
800
TTTTCATGAGCCCATGAAGGCATCGAAATCAATCGCCAGCTAAACACCTGTTTTCGTGGGTGATTTTTATCTCATGACGCCAACACCCTCAATGTG
900
AAACAGTGTTTAAAGTAGTTATGACTGATTTTTTACGCGATGACATCAGGTTCTCGGTCAAATCCTCGGTGAGGTAAATGCCGAACAGAACGCCAGGA
m t d f l r d d i r f l g q i l g e v i s o q e g q e
1000

```

FIG. 3(2)

GCTTATGAAGTGGTGAACAAGGCGGCTGACTTCTTTTGATATGGCAAGGGAACGGCGAAATGGATAGCCTGGTTCAGGTTTTGGACGGCATTACT
 v y e l v e q a r l t s f d i a k g n a e m d s l v q v f d g i r 1100

 CCGCCAAAGGCAACACCGATTGCTCGCGCATTTTCCCACTTGGCTTGGCTGAACCTGGCGGAAGACCTCTACGATGAAGAGCTTCGTGAACAGGCTC
 p a k e t p l a r a f s h f o l l o n l a e d l y d e e l r e q a l 1200

 TCGATCGAGGCGACACCCCTCGGACAGCACTTTGATGCEACCTGGCTGAACCTCAATGAGGGCAATGTTGGCGCAGAAGCTGTGCGCGATGTGCTGCG
 d a g d t p p d s t l d a e u l k l n e g n v g a e a v a d v l r 1300

 CCACTGCTGAGGTGGCGCGGTTCTCACTCGGCAACCACTGAGACTCGCGCGGCACTGTTTTGATGGCGAAAAGTGGATCACCACCCACATCGCTGAA
 n a e v a p v l t a h p t e t r r r r t v f d a q k w i t t h m r e 1400

 CGGCGCGTTTGGAGTCTGGGAGGCTACCGCTCGTACGCAAGCAAGTTGGATGAGATCGAGAAGAACATCGCGCTCGCATCACCATTCTTGGCGAGA
 r h a l q s a e p t a r t q s k l d e i e k n i r r r i t l l w q t 1500

 CGGCGTGGATTGGTGGCGCGCGCACGATCGAGGACGAGATCGAAGTAGGCGTGGCTACTACAAGCTGAGCCTTTTGGAGAGATTCCAGCTATCAA
 a l i r v a r p r i e d e i e v g l r y k l s l l e e l p r i n 1600

 CCGTATGTGGCTGTGGAGCTTGGAGCGTTTCGGCGAGGGGTGTTCTTGAAGCCCGTGGTCAAGCCACGTTCTGGATTGGTGGAGACACGACGGT
 r d v a v e l r e r f g e g v p l k p v w k p g s v i g g d h d g 1700

FIG. 3(3)

AGCTCAGCCTGTCCGACCGCATGAATAAGGTCAACCCCGAGCTGCTTGGCTGGCAGATCGACGGCACAACGAGCTGCCAAGCGCGGTGGATGAGCCTTA
 l s l s d r m n k v t p q l l e l e d a g h n d v p s r v d e p y 1900

 TCGACGCGCGCTCCATGCGGTTGGGAGCGTATCTCGGACGACGGGAGCGTGATCGGCGAGGACGCGCTTGAGGCGGTGTGGTTCAAGGTCTTTACT
 r r a v h g v r p r i l a t t a e l i g e d a v e g v w f k v f t 2000

 CCATACGCATCTCCGCAAGATTCTTAACGATGCGTTGACCATTCATTCCTCTGCGTGAATCCAGGACGTTCTCATTGCGGATGATCGTTTGTCTG
 p y a s p e e f l n d o l t i d h s l r e s k d v l i a d d r l s y 2100

 TGCTGATTTCTGCCATCGAGAGCTTTGGATTCAACCTTTACGCACTGGATGTGCGCAAAACTCGAAAGCTACGAGGACCTCTCAACGAGCTTTTGA
 l i s a l e s f g f n l y a l d l r q n s e s y e d v l t e l f e 2200

 ACGGCGCAAGTCACCGCAAACTACCGGAGCTGTCTCAAGCAGAGAAGCTTGAGGTGCTGCTGAAGGAACTCGGAGCCCTCGTCCGCTGATCCGCGAC
 r a q v t e n y r e l s e e k l e v l l k e l r s p r p l i p h 2300

 GGTTCAGATGAATACAGCGAGGTCAACGACCGGAGCTCGGATCTTCCGACCGCGCTCGGAGGCTGTTAAGAAATTGGGCGACGGATGGTGGCTCACT
 g s d e y s e v t d r e l g l f r t a s e o v k k f g p r m v p h c 2400

 GCATCATCTCCATGGCATCAGGTCACCGATGTGCTCGAGCCGATGGTGTGCTCAAGGAAATTCGACTCATCGGCGCAACGGGCAACCCACGCGG
 i i s m a s s v t d v l e p m v l l k e f g l i a a n g d n p r g 2500

 CACCGTCGATGTATCCCACTGTTCCAAACCATCGAAGATCTCCAGGCGCGCGCGGAATCCTCGACCAACTGTGGAAAATTGATCTCTACCGCAACTAC
 t v d v i p l f e t f e d l q a g a g i l d e l u k i d i y r n y 2600

FIG.3(4)

CTCCTGCAGCGGCAACCTCCAGGAAGTCATGCTCGGTTACTCCGATTCACAAGGATGGCGGATATTTCTCCGAAACTGGGCGCTTTACGACGGG
 l l q r d n v q e v m l g y s d s n k d g s y f s a n u a l y d a e 2700

AACTGCAGCTCGTCCAACTATGCEGATCAGCCGGGCTCAAGCTTCGCTGTTCCAGCGCGTGGTGGCAACGTCGGCGCGGTGGGGAECTTCTACGA
 l l q l v e l c r s a g v k l r l f h g r g g t v g r g g s p s y d 2800

CGCGATTCTTCCCAAGCCAGGGGGCTGTCCAAGGTTCCGTGGCATCACCGAGCAGGGCGAGATCATCTCCGTAACTACGGCAACCCGAAACCGGG
 a i l a q p r g a v q g s v r i t e q g e i i s a k y g n p e t a 2900

CGCGAAACCTCGAAGCCCTGGTCTCAGCCACGCTTGAGGCATCGCTTCTCGAGCTCTCCGAACCTCAGGATCACCAAGCGCGGTACGACATCATGAGT
 r r n l e a l v s a t l e a s l l d v s e l t d h q r a y d i m s e 3000

AGATCTCTGAGCTCAGCTTGAAGAAGTACGCTCTTGGTGCAGCAGGATCAAGGCTTCATCGATTACTTCACCGAGTCCAGCGCGGTGCAGGAGATTGG
 i s e l s i k k y a s l v h e d q g f i d y f t q s t p l q e i g 3100

ATCCCTCAACATCGGATCCAGGCTTCTCAGCAAGCAGACCTCTCGGTGGAAGATTGGCAGCATCCATGGGTGCTCAGCTGGTCACAGCTCTCT
 s l n i g s r p s s r k q t s s v e d l r a i p u v l s w s q s r 3200

GTCATCTGECAGGCTGCTTTGGTGTCCGAACCCATTAGAGCAGTGCATTGGCCAAAGGGGAGAGGECACCCAAAGCATTGCCGAGCTGCAAACTCA
 v m l p g u f g v g t a l e q u i g e g e q a t q r i a e l q i l n 3300

FIG.3(5)

ATGAGTCTCGGCAATTTTTCACCTCAGTGTTCGATAACATGGCTCAGGTGATGTCCAGGCACAGCTCGCTTTGGCAAGCTCTACGCAAGCTGATCCC
 e s u p f f t s v l d n m a q v m s k e e l r l a k l y a d l i p 3400

AGATACGGAAGTAGCCGAGCGAGTCTATTCCGTCTCCGCGAGGAGTACTTCTGACCAAGAGATGTTCTCGTAATCAGCGGCTCTGATGATCTGCTT
 d t e v a e r v y s v i r e e y f l t k k m f e v i t g s d d l i 3500

GATGACAAACCACTTCTCGACGCTCTGTCCAGCGCGATACCCCTACCTGCTTCCACTCAAGCTGATCCAGGTAGAGATGATGGAGCTTACCGAAAG
 d d n p l l a r s v q r r y p y l l p l n v i q v e m m r r y r k g 3600

CGGACCAAGCGAGCAAGTGTCCGCAACATTCAAGTGAACATGAACGGTCTTTCCACTCGCTGCGCAACTCCGGCTAGTCCAGCGGCTGGGTAGTAC
 d q s e q v s r n i q l t m n g l s t a l r n s g 3700

TGGTGATACTGTCTAAAGTTATTCCAAATCAGGTGGGCATAAGGTTACCTCGGTTCTCAACCGCAAGGAACATTTTCCACATGGCATTGACGCTTC
 3800

AAATCATECTGCTCGTCGCGAGGCTGCTCATGACGGTTTTGCTTTGCTGCAAGGGCAAGGGCGGAGCTTCCAGGCTCTTGGGTGGCGGTGTGCA
 3900

GTCCAACTTTTCCGGCTCCACTGTTGTTGAAAAGAACCTGGATCGGCTCAECATTTTGGTTGCGGTTATCTGGATTGTGTGCATTGTCCCACTCAACCTC
 4000

ATCCAGACTTATTCTAAGCAAGAGCTTAAAAAGAGCGGTTCCCTTTTCATAGGGGAGCGGCTTTTTTGGGTTTTGTCGAGCTGTTGTCTCCCACTGT
 4100

TCCTCGGTGTGCACTTTCGACACCAAGATTTCGGCAAGTGGTGGTCAAAATTCGAAAATTTGGTGGCTAATTACATACATTCCAAATTTTCCTAAGG
 4200

FIG. 3(6)

ACATCTTTAAAGGGGAAGTGTTCGGACGGAAAGTGGAGTCTATAAAACGGCAGGTTAAACGGCTGCCATAGGGGATTTTTCGGTGGGACACCTGGT
 4300
 GTAAAGTGGGGTTAAAAACGTGACCTTCGTTATAAAACAGAAATCTATAGAACGATAGGTAACCTGCACTAGGTTTATCTATAGCCGAATAGAAAAT
 4400
 ACTCCGCTCGACAGCAGTCACTTAGCTGAAGGCTTTAACATGGACCCCTCAGATCTAGCCTGGATTETCGCAGCTTTTGGGTGGTAAGCCTCATGTTT
 4500
 CCGGATTTGTCCTGCTTACGGCGGATGCTGGTGGGCAACACGTTCTTAAACAGTTTCATGATGGTTATGAGCTCACTTGGAAATCATCAGCCTTGCT
 4600
 ACATCATTTATGGACACGGACTTGTCTTAGGAAACTCATCGGTGGGTGGGGAATTATCGGAAATCCCTTGAATACTTCGGCTTCGGCAACATTATGGA
 4700
 AGATGACGGCAACGGAGACCTCATGTGGGCGGCTTCTACATTCTGTTGGTGGCAATCTCACTCGCACTTGTTCATCTGGTCCAGCGGGGGCATGCCC
 4800
 TTTGGAGCGTGGCTGCTTTCGGTGTCTGTGGTTCACCTTTGTGTACGGCCCACTGGCACACTGGGTTTTTCGTATCGATGATC 4885

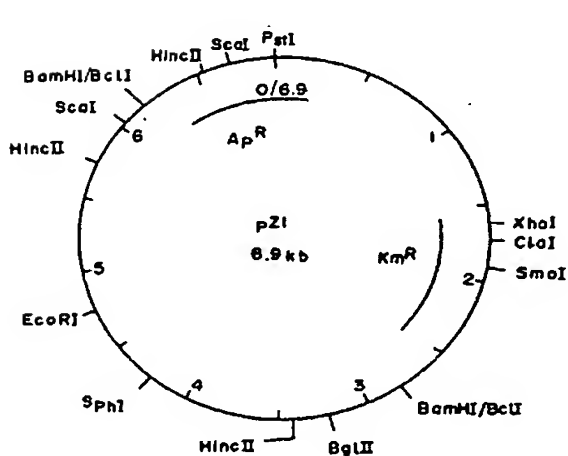


FIG. 4

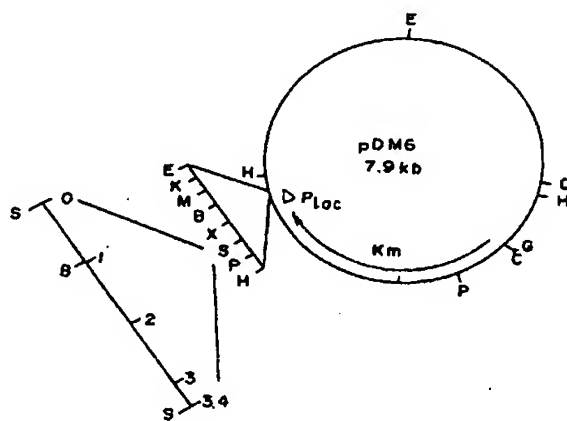
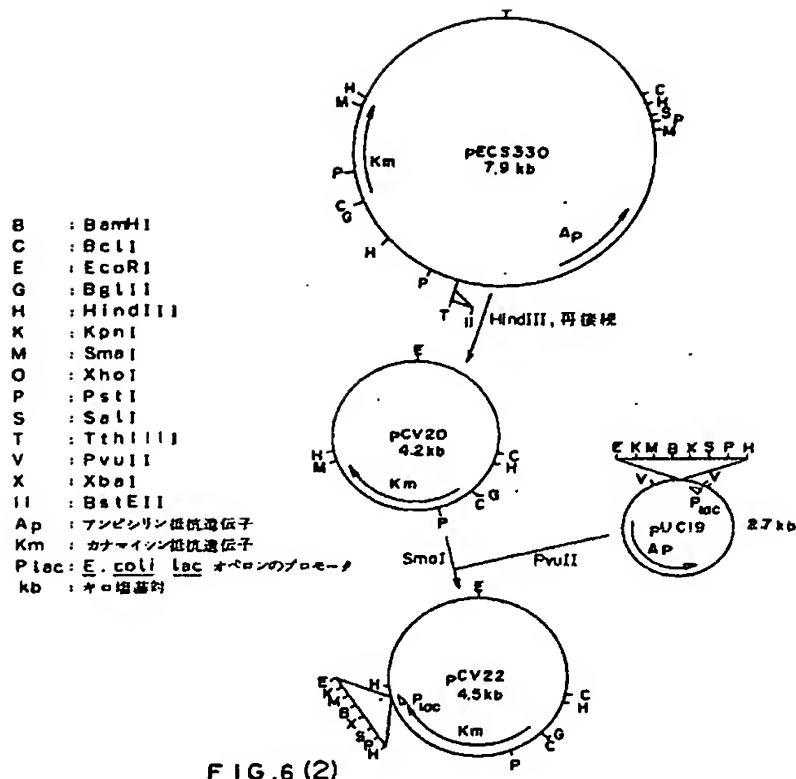


FIG. 7



第1頁の続き

©Int. Cl. 9

C 12 P 13/08
13/10

13/12
13/14
13/24
9/88
(C 12 N 15/60)
(C 12 R 1:15)
(C 12 N 1/21)
(C 12 R 1:13)
(C 12 P 13/06)
(C 12 R 1:13)
(C 12 P 13/08)
(C 12 R 1:13)
(C 12 P 13/10)
(C 12 R 1:13)
(C 12 P 13/12)
(C 12 R 1:13)
(C 12 P 13/14)
(C 12 R 1:13)
(C 12 P 13/24)
(C 12 R 1:13)
1:15)

識別記号

庁内整理番号

A 8931-4B
C 8931-4B
B 8931-4B
A 8931-4B
C 8931-4B
A 8931-4B
A 8931-4B
B 8931-4B
A 8931-4B
A 8931-4B
7823-4B

⑭発明者	ゲオルク・テイルバツハ	ドイツ連邦共和国ビーレフェルト・グンストシュトラッセ 21
⑮発明者	イエルン・カリノフスキー	ドイツ連邦共和国ビーレフェルト1・ドレーゲシュトラッセ 25
⑯発明者	アルフレート・ビューラー	ドイツ連邦共和国ビーレフェルト・アム・ヴァルトシユレスヒエン 2
⑰発明者	マイク・オリーガン	フランス国ストラスブール・リュ・ド・シャフハウゼ 3
⑱発明者	ジャン・フランソワ・ヴィレ	フランス国リンゴルスハイム・リュ・デ・ミュゲ 26
⑲発明者	ビエール・ルバージュ	フランス国ストラスブール・リュ・ド・ラ・デイヴィジョン・ルクラール 1
⑳発明者	イーヴ・ルモワヌ	フランス国ストラスブール・ノイドルフ・リュ・デ・アリジェ 4